



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 359 981
A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 89114818.1

(51) Int. Cl. 5: A61K 45/06, A61K 33/24,
//(A61K33/24,31:685)

(22) Anmeldetag: 10.08.89

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten:
ES + GR.

(30) Priorität: 18.08.88 DE 3827974

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
28.03.90 Patentblatt 90/13

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
Sandhofer Strasse 116
D-6800 Mannheim 31(DE)

(72) Erfinder: Grunicke, Hans Hermann, Prof.
Schützenstrasse 64
A-6060 Mils(AT)
Erfinder: Herrmann, Dieter, Dr.med.
An der Neckarspitze 13
D-6900 Heidelberg(DE)
Erfinder: Hofmann, Johann, Dr.
Giessenbach 328
A-6108 Scharnitz(AT)
Erfinder: Bosies, Elmar, Dr.phil.nat.
Delpstrasse 11
D-6904 Weinheim(DE)

(54) **Pharmazeutische Kombinationspräparate und deren Verwendung als antineoplastische Arzneimittel.**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische Kombinationspräparate zur Anwendung bei der antineoplastischen Therapie. Die Präparate enthalten als Wirkstoffe Verbindungen, die die Proteinkinase C hemmen, in Kombination mit Lipiden, Lipidanaloga, Cytostatica oder Verbindungen, die die Phospholipasen inhibieren.

EP 0 359 981 A1

Pharmazeutische Kombinationspräparate und deren Verwendung als antineoplastische Arzneimittel

Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische Kombinationspräparate und deren Anwendung als antineoplastische Arzneimittel.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind insbesondere Kombinationspräparate, die als Wirkstoffe Verbindungen enthalten, die als Inhibitoren der Proteinkinase C fungieren, in Kombination mit einem 5 antineoplastisch aktiven Wirkstoff, wie beispielsweise mit Lipiden oder deren Derivate, mit cytostatisch wirksamen Verbindungen oder mit Verbindungen, die als Inhibitoren von Phospholipasen fungieren.

Insbesondere betrifft die Erfindung Kombinationspräparate von Proteinkinase-C-Inhibitoren mit cytostatisch wirksamen Verbindungen.

Die Verwendung von Chemotherapeutica ist in der antineoplastischen Therapie schon seit längerer Zeit 10 ein anerkanntes und weit verbreitetes Behandlungsprinzip. Diese Chemotherapeutica werden eingesetzt, um maligne Zellen mit ungehemmten Wachstumsverhalten zu zerstören, wobei normale oder gesunde Zellen möglichst wenig geschädigt werden sollen. Als Chemotherapeutica kommen fast ausschließlich jedoch 15 Cytostatica zum Einsatz, die im allgemeinen unspezifisch toxisch auf normale und maligne Zellen wirken und das Wachstum der Zellen hemmen. Diese Cytostatica haben eine sehr enge therapeutische Anwendungsbreite, was zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führt.

Solche Nebenwirkungen sind beispielsweise Blutungen, Übelkeit, Erbrechen, Dysponie, Allergien, Aloperien, Herzmuselschädigungen, Herzrhythmusstörungen, Perikarditis, periphere und zentrale Neuropathien, Schmerzen, Nephropathien, Stomatitis, Diarrhoe, Fieber, Hautveränderungen, Infektionen, Herzinsuffizienzen, oder Veränderungen des Bewußtseinszustandes.

Die vorliegende Erfindung hat sich deshalb zur Aufgabe gestellt, die Wirkung von Chemotherapeutica 20 zu steigern, ohne daß dies mit einer Steigerung der toxischen Effekte dieser Wirkstoffe einhergeht. Es sollen Arzneimittel zur Verfügung gestellt werden, die eine Verminderung der oben genannten Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Chemotherapeutika bewirken. Ziel dabei ist es, die therapeutische Anwendungsbreite dieser Chemotherapeutica zu vergrößern. Im Falle der Cytostatica soll die antitumorale 25 oder antiproliferative Wirkung verstärkt werden, so daß diese Cytostatica in geringeren Dosen verabreicht werden können und somit eine Verminderung oder Aufhebung der durch diese Mittel hervorgerufenen Nebenwirkungen erfolgt.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß Verbindungen, die Proteinkinasen C inhibieren, in 30 Kombination mit antineoplastischen Wirkstoffen, wie z.B. mit Lipiden, Lipidanaloga, Cytostatica oder Inhibitoren von Phospholipasen eine synergistische Wirkung ausüben. Insbesondere wurde gefunden, daß bei der Kombination mit Cytostatika eine Verstärkung des antiproliferativen oder antitumoralen Effektes auftritt.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff "Proteinkinase-C-Inhibitoren" solche 35 Verbindungen verstanden werden, die die Calcium- und Phospholipid-abhängigen Proteinkinasen-C bzw. die entsprechenden Isoenzyme in zellfreien Extrakten oder in intakten Zellen hemmen (Nishizuka (1986), Science 233, 305 - 312); Nature (1988), 334, 662-665. Solche Stoffe können nach üblichen Verfahren aus Naturstoffen isoliert werden, oder auch synthetisch hergestellt werden. In diesem Sinne kommen beispielsweise die folgenden Verbindungen in Frage: Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxy-flavon, Horn, F. (1985), J. Biochem. 148, 533 - 538); Phorbolester, wie z. B. 12-O-Tetradeca-noylphorbol-13-acetat (TPA, Regazzi, R. 40 (1986), Int. J. Cancer 37, 731 - 737); Tamoxifen (O'Brien et al. (1985), Cancer Research 45, 2462 - 2465); Staurosporin (Tamaoki, T. et al. (1986), Biochem. Biophys. Res. Comm. 135, 397 - 402); oder Lipidanaloga, wie beispielsweise schwefelhaltige Phospholipide, insbesondere Ilmofosin, oder Lysolecithine, insbesondere ET-18-OCH₃. Mit Hilfe der in Beispiel 1 beschriebenen allgemeinen Verfahren kann ohne weiteres experimentell festgestellt werden, ob eine Verbindung als Inhibitor der Proteinkinasen C wirkt und im Sinne 45 der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann.

Ilmofosin und dessen Verfahren zur Herstellung ist aus EP-B-0,050,327 bekannt. Die Verbindung ist dort als Beispiel 33 mit dem systematischen Namen 3-Hexadecylmercapto-2-methoxypropanol-1-phosphorsäure-remonocholinester beschrieben. Ilmofosin gehört zur Gruppe der sog. Alkyllysolecithin-Derivate und ist als Verbindung mit cancerostatische Eigenschaften bekannt.

50 ET-18-OCH₃, dessen systematischer Name 4-Hydroxy-7-methoxy-N,N,N-trimethyl-3,5,9-trioxa-4-phosphohaheptacosan-1-aminium-4-oxid lautet, ist aus DE PS 26 19 686 bekannt. Diese Verbindung ist dort als Antitumormittel beschrieben.

Als Proteinkinase-C-Inhibitoren im Sinne der vorliegenden Erfindung kommen insbesondere Ilmofosin und ET-18-OCH₃ in Frage. Weitere bevorzugte Verbindungen sind Quercetin, Tamoxifen und Staurosporin bzw. dessen chemisch modifizierten Derivate.

Zu der Gruppe der antineoplastisch aktiven Wirkstoffen gehören unter anderem Lipide oder Lipid-Analoga, wie z.B. Phospholipide, natürlich vorkommende oder auch synthetisch hergestellte Lipide, die einen Phosphatrest enthalten. Hierzu zählen die Glycero- und die Sphingophosphatide sowie deren Derivate. Aus der Gruppe der synthetischen Derivate sind insbesondere folgende Strukturen zu nennen: 1-O-Alkylphospholipid-Derivate, wie zum Beispiel ET-18-OCH₃ (Weltzien, H.U. et al. in: *Ether Lipids. Biochemical and Biomedical Aspects*; Ed. Mangold, H.K. and Paltauf, F.; Academic Press, New York, 277-308); 1-S-Alkylphospholipid-Derivate, wie zum Beispiel Ilmofosin (3-Hexadecyl-mercapto-2-methoxymethyl-propyl-1-phosphocholin); Alkyl-, Alkenyl- und Acylphosphocholin-bzw. ethanolamin-Derivate, wie beispielsweise Hexadecylphosphocholin (HPC); halogenierte Analoga von Alkyl-, Alkenyl- und Acylglycerol-Derivaten (Brackerts, H. (1987) *Lipids* 22, 897-903).

Zu den oben genannten Lipiden oder Lipid-Analoga gehören auch Lipide, die eine Kohlenhydratgruppe enthalten und als Glykolipide bezeichnet werden. Es werden Cerebroside und Ganglioside unterschieden. Ist der Galactoserest eines Cerebrosids mit Sulphat verestert, spricht man von Sulphatiden. Alle Sphingosin enthaltenden Lipide werden als Sphingolipide zusammengefaßt. Ferner kommen auch Neutrallipide, wie z.B. Triglyceride und Cholesteride sowie deren Derivate in Frage. Insbesondere sind in dieser Gruppe die O-Alkyl- und halogenierten Abkömmlinge des Triacylglycerols zu nennen.

Zu der Gruppe der antineoplastischen Wirkstoffe zählen ferner insbesondere die Chemotherapeutika. Darunter werden im folgenden körperfremde Substanzen verstanden, die geeignet sind und dazu verwendet werden, um Mikroorganismen, Parasiten (Antibiotika) oder Tumorzellen (Cytostatica) zu schädigen oder zu zerstören. Dabei sind insbesondere Cytostatica bzw. deren Derivate aus folgenden Cytostaticagruppen zu nennen: Alkylantien, wie z.B. Cyclophosphamid, Chlorambucil, Melphalan, Busulphan, N-Lost-Verbindungen, Mustargen; Metallkomplex-Cytostatica, wie z.B. Metallkomplexe des Platins, Palladiums oder Rutheniums, beispielsweise Cis-Diammino-dichloroplatin (II) (CDDP); Anti-metabolite, wie z.B. Methotrexat, 5-Fluoruracil, Cytarabin; Naturstoffe, wie beispielsweise Vinblastin, Vincristin, Vindesin usw.; Antibiotika, wie z.B. Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Bleomycin, Mitomycin usw.; Hormone und Hormonantagonisten, wie z.B. Diethylstilbostrol, Testolacton, Tamoxifen, Aminoglutethimid; sonstige Verbindungen, wie z.B. Hydroxyharnstoff oder Procarbacin, sowie Corticoide, wie z.B. Prednisolon.

Als antineoplastische Wirkstoffe im Sinne der vorliegenden Erfindung kommen insbesondere Platin-Komplex-Verbindungen, wie beispielsweise cis-Dichloro-diammin-Platin-(II) bzw. (IV), Mustargen und Doxorubicin (Adriamycin) in Frage.

Ferner gehören zu der Gruppe der antineoplastischen Wirkstoffe auch Verbindungen, die die Phospholipasen inhibieren, wie z.B. Mepacrin (Hofmann, S.L. et al. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 215, 237-244), Antiphlogistica, wie z.B. Indomethacin etc., Neomycin, Psychopharmaka, Trifluoperazin etc..

In besonderen Fällen kann es auch vorkommen, daß eine Verbindung sowohl in die Gruppe der bereits bekannten antineoplastischen Wirkstoffe im Sinne der oben angegebenen Definition fällt, als auch der Gruppe der Proteinkinase-C-Inhibitoren zugeordnet werden kann. Dies ist beispielsweise der Fall für Ilmofosin und ET-18-OCH₃. Dies schließt jedoch die Kombinationsmöglichkeit mit anderen antineoplastischen Wirkstoffen nicht aus, solange mindestens einer der Wirkstoffe als Proteinkinase-C-Inhibitor fungiert.

Die Anwendung einer Kombinationstherapie mit Hilfe der pharmazeutischen Präparate der vorliegenden Erfindung bietet den Vorteil der synergistischen Verstärkung der antitumoralen Wirkung der Einzelsubstanzen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit der Reduktion der Dosen und damit der Toxizitäten der Einzelsubstanzen bei gleichzeitiger Erhaltung der antitumoralen Wirksamkeit bei Kombination der Einzelsubstanzen. Eine Kombinationstherapie der oben genannten Einzeltherapieprinzipien bietet ferner die Möglichkeit der Überwindung von Cytostatika-Resistenzen, wobei sowohl Substanzgruppenresistenzen als auch Mehrfachresistenzen (pleiotrope Cytostatikaresistenz) in Frage kommen.

Bei der Anwendung der Kombinationstherapie ist es möglich, die Wirkstoffe in einer sogenannten fixen Kombination, d.h. in einer einzigen pharmazeutischen Formulierung zu verabreichen, in der beide Wirkstoffe enthalten sind, oder eine sogenannte freie Kombination zu wählen, bei der die Wirkstoffe in Form von getrennten pharmazeutischen Formulierungen gleichzeitig oder aber auch nacheinander appliziert werden können. Die Herstellung solcher Kombinationspräparate erfolgt nach üblichen in der galenischen Technik bekannten Verfahren.

Sind die Wirkstoffe Feststoffe, so können die Wirkstoffe nach üblichen Verfahren zu festen Arzneimittelpräparaten (Tabletten, Pellets, Komprimetten, Geleekapseln) verarbeitet werden, indem man z.B. beide Wirkstoffe miteinander vermischt und mit üblichen Träger- oder Hilfsstoffen zusammen beispielsweise zu Tabletten verpreßt. Es ist aber auch möglich, die Wirkstoffe zusammen mit geeigneten pharmazeutischen Hilfsstoffen getrennt voneinander in einer verkaufsfertigen Verpackungseinheit zur Verfügung zu stellen, wobei die Verpackungseinheit die beiden Wirkstoffe in getrennten pharmazeutischen Formulierungen enthält.

Werden die Wirkstoffe in Form von Injektionslösungen zur Verfügung gestellt, so können diese die in Frage kommenden Wirkstoffkombinationen in lyophilisierter Form oder bereits in fertig injizierbarer gelöster Form enthalten. Prinzipiell ist es aber auch möglich, je eine parenterale Formulierung für jeden in Frage kommenden Wirkstoff in einer einzigen Verpackungseinheit zur Verfügung zu stellen, so daß die Injektionslösungen gegebenenfalls getrennt voneinander appliziert werden können. Bei Unverträglichkeiten der Wirkstoffe miteinander ist diese Form der Anwendung die bevorzugte Methode.

5 Im Falle der parenteralen Darreichungsform können die Wirkstoffe auch in Substanz, gegebenenfalls zusammen mit üblichen pharmazeutischen Hilfsstoffen, beispielsweise in lyophilisierter Form vorliegen und durch Zugabe von pharmazeutisch üblichen Injektionsmedien rekonstituiert oder solubilisiert werden.

10 Die pharmazeutischen Präparate kommen in flüssigen oder fester Form zur enteralen oder parenteralen Applikation. Hierbei kommen alle üblichen Applikationsformen in Frage, beispielsweise Tabletten, Kapseln, Dragees, Sirupe, Lösungen, Suspensionen. Als Injektionsmedium kommt vorzugsweise Wasser zur Anwendung, welches die bei Injektionslösungen üblichen Zusätze wie Stabilisierungsmittel, Lösungsmittel und Puffer enthält. Derarige Zusätze sind z.B. Mannit, Tartrat- und Citratpuffer, Ethanol, Komplexbildner wie zum

15 Beispiel Ethylenediamintetraessigsäure und deren nichttoxischen Salze, sowie hochmolekulare Polymere wie flüssiges Polyethylenoxid zur Viskositätsregelung. Flüssige Trägerstoffe für Injektionslösungen müssen steril sein und werden vorzugsweise in Ampullen abgefüllt. Feste Trägerstoffe sind zum Beispiel Stärke, Lactose, Kieselsäuren, höhermolekulare Fettsäuren wie Stearinsäure, Gelatine, Agar-Agar, Calciumphosphat, Magnesiumstearat, tierische und pflanzliche Fette, feste hochmolekulare Polymere wie Polyethylenglykole; für orale Applikation geeignete Zubereitungen können gewünschtenfalls Geschmacks- und Süßstoffe enthalten.

20 Die Dosierung kann von verschiedenen Faktoren, wie Applikationsweise, Spezies, Alter und individuellen Zustand abhängen. Die täglich zu verabreichenden Dosen liegen bei etwa 0.05 - 100 mg/kg Körpergewicht pro Einzelkomponente. Beispielsweise kann im Falle einer Kombination von CDDP und Quercetin eine 25 Dosis von 1 - 10 mg/kg, insbesondere 3 mg/kg CDDP, oder 10 - 50 mg Quercetin, insbesondere 20 mg/kg verwendet werden. Die Menge des jeweiligen Wirkstoffes pro Darreichungsform variiert zwischen 5 und 1000 mg.

25 Bei den Kombinationspräparaten kann sich das Verhältnis zwischen den als Inhibitoren der Proteinkinase C fungierenden Wirkstoffen und den Lipiden, Lipidanaloga, Cytostatica oder Inhibitoren der Phospholipasen in einem weiten Bereich bewegen. So sind beispielsweise molare Verhältnisse zwischen 1:1000 und 1000:1 möglich, je nach Wirksamkeit der in Frage kommenden Wirkstoffe. Im Falle der Kombination mit Cytostatica ist ein Verhältnis zwischen 1:100 und 100:1 bevorzugt. Insbesondere kommt bei der Kombination von Ilmofosin oder ET-18-OCH₃ mit cis-Diammino-dichloro-platin(II) ein Verhältnis von 1:50 bis 50:1, bevorzugt jedoch von 1:1 bis 50:1 in Frage.

30 35 Im Sinne der vorliegenden Erfindungen kommen beispielsweise die folgenden Kombinationspräparate in Frage:

40	Proteinkinase-C-Inhibitor	Antineoplastischer Wirkung	Molares Verhältnis
	A	B	A : B
45	Quercetin	cis-DDP	ca. 100 : 1
	Quercetin	Mustargen	ca. 800 : 1
	Tamoxifen	cis-DDP	ca. 10 : 1
	Staurosporin	cis-DDP	ca. 1 : 100
	Ilmofosin	cis-DDP	ca. 10 : 1
	ET-18-OCH ₃	cis-DDP	ca. 10 : 1

50 Die folgenden Beispiele belegen die synergistische Wirkung einiger repräsentativer Kombinationspräparate, und stehen stellvertretend für den in den Ansprüchen näher gekennzeichneten Erfindungsgedanken:

55 Beispiel 1:

Allgemeines Verfahren zur Untersuchung von Verbindungen hinsichtlich ihrer Funktion als Inhibitor der Proteinkinase C'.

a) Reagentien

Pferdeserum und DMEM (Dulbeccos modified minimal essential medium) wurden von Boehringer Mannheim, FRG, bezogen. Cis-Diammino-dichloro-platin(II) stammte von Homburg Pharma, Frankfurt. 5 $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (10 Ci/mmol) und ^{32}P -orthophosphat waren von Radiochemical Centre, Amersham, UK; GF/F-Filter und DE-52-Cellulose von Whatman, Clifton, NJ (USA); Leupeptin, Aprotinin, Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon), Tamoxifen, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA), β -Glycerophosphat, Histon H1 (Typ III S), 3-N-Morpholino-propansulfonylsäure (MOPS), L-alpha-Phosphatidyl-L-serin und 1,2-sn-Diolein stammten von Sigma, München, FRG. Proteinkinase C wurde von Merck, Darmstadt, FRG 10 bezogen. Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS-HCl), Ethylenglykol-bis-(aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA), Natriumdodecylsulfat (SDS) und Triton X-100 waren von Serva, Heidelberg. Mustargen (HN2) wurde von Aldrich, Steinheim erhalten. Staurosporin stammte von Prof. Matter, Ciba-Geigy, Basel (CH). Ilmofosin stammte von Boehringer Mannheim, FRG, und wurde wie von Bosies et al. (Lipids, 1987, 22, 947 15 -951) beschrieben synthetisiert. Für die Untersuchungen wurde eine Stammlösung von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ilmofosin in DMEM plus 10% fötales Kälberserum (FCS) verwendet. Die Stammlösung wurde bei 4 °C gelagert. Doxorubicin (Adriamycin, Adriablastin^R) stammte von Farmitalia/Carlo Erba GmbH, Freiburg, FRG.

b) Hemmung der Proteinkinase C (PK-C) - (in vitro Methode)

20 Proteinkinase C wurde aus Walker-Zellen durch Chromatographie an DEAE-Cellulose der Zellextrakte nach der von Kreutter et al. (J.Biol.Chem. 260, 5979-5984 (1985)) beschriebenen Methode angereichert. Zu den Extrakten wurde jedoch zusätzlich 1 mM Phenylmethan-sulfonylfluorid, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin und 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin zugegeben. Die Proteinkinase C Aktivität wurde durch Messung des ^{32}P -Einbaus von 25 $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ in H1 Histon nach der Methode von Fabbro et al. (Arch. Biochem. Biophys. 239, 102 - 111 (1985)) bestimmt. Die Reaktionsmischung (125 μl) enthielt 0.5 μCi $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM CaCl₂, 700 μM EGTA, 50 μg Histon, 6.75 μg L-alpha-Phosphatidyl-L-serin und 0.675 μg 1,2-sn-diolein. Die Reaktionzeit betrug 10 Minuten bei 32 C. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 30 20 % Trichloressigsäure (w/v) gestoppt. Das Protein wurde auf Whatman GF/F-Filterpapier ausgefällt und mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers gezählt.

c) Hemmung der Proteinkinase C' (PK-C') - (in vivo Methode) Phosphorylierung von ribosomalem Protein S6

35 Zellen wurden in DMEM mit 0.5 % Pferdeserum (v/v) über einen Zeitraum von 15 h gezüchtet und dann in phosphatfreiem Medium inkubiert. Nach 1 h wurden 4 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 32P-Orthophosphat und nach weiteren 30 Minuten 0.5 μM TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) und 50 μM Quercetin zugegeben. Die Zellen wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.33 M Sacharose, 1 % Triton X-40 100 (v/v), 1 mM Phenylmethansulfonylchlorid, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin und 80 mM β -Glycerophosphat lysiert. Das Lysat wurde nach 10 Minuten bei 0 C bei 30,000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Die Pellets wurden einmal durch Resuspension mit dem Lyse-Puffer gewaschen und anschließend bei 30,000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und bei 100,000 g 3 Stunden lang zentrifugiert. Die Pellets wurden in 8 M Harnstoff resuspendiert und für 10 Minuten gekocht. Die Extrakte 45 wurden durch eindimensionale SDS-Gelelektrophorese in 15-%-igen Polyacrylamid-Gelen analysiert (Laemmli, U.K. (1970), Nature 227, 680-685). Nach Blotten des Gels auf Nitrocellulose wurde das S6-Protein identifiziert durch Zugabe von anti-S6-Antiserum.

50 Beispiel 2:Quercetin als Inhibitor der Proteinkinase C

55 Wie in Beispiel 1 näher beschrieben wurde der Einfluß von Quercetin auf die Proteinkinase C und auf die Vermehrung von Walker-Carzinoma-Zellen in Kultur untersucht. Quercetin wurde in Dimehtylsulfoxid (DMSO) solubilisiert. Die Lösung in DMSO wurde zur Ansatzmischung bis zu einer DMSO-Endkonzentration von 1 % zugegeben. Eine äquivalente Menge von reinem DMSO wurde zu der Kontrollgruppen zugegeben.

Der Einfluß von Quercetin auf die Zellvermehrung wurde durch Zugabe des Wirkstoffes in DMSO zum Kulturmedium bis zu einer Endkonzentration von 0.1 % untersucht. Die Zellen wurden in Gegenwart des Wirkstoffes 48 Stunden lang gezüchtet. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich reines DMSO. 100 % der Proteinkinase C Aktivität entspricht 44.8 pmol/min auf H1 übertragenem ^{32}P .

5 Aus den erhaltenen Daten geht hervor, daß Quercetin als Inhibitor der Proteinkinase C fungiert ($\text{IC}_{50} = 25 \mu\text{M}$).

Beispiel 3:

10

Tamoxifen als Inhibitor der Proteinkinase C

Analog wie in Beispiel 2 beschrieben wurde der Einfluß von Tamoxifen auf die Proteinkinase C untersucht. Aus den erhaltenen Daten konnte der IC_{50} -Wert zu $11.20 \mu\text{M}$ bestimmt werden.

Beispiel 4:

20

Staurosporin als Inhibitor der Proteinkinase

Analog wie in Beispiel 2 beschrieben wurde der Einfluß von Staurosporin auf die Proteinkinase C untersucht. Der IC_{50} -Wert konnte zu $0.048 \mu\text{M}$ bestimmt werden.

25

Beispiel 5:

30

Ilmofosin als Inhibitor der Proteinkinase C

Analog wie in Beispiel 2 beschrieben wurde der Effekt von Ilmofosin auf die Proteinkinase C untersucht. Der IC_{50} -Wert beträgt $20 \mu\text{M}$.

35

Beispiel 6:

40

ET-18-OCH₃ als Inhibitor der Proteinkinase C

Analog wie in Beispiel 2 beschrieben wurde der Einfluß von ET-18-OCH₃ auf die Proteinkinase C untersucht. ET-18-OCH₃ inhibiert ebenso wie Ilmofosin die Proteinkinase C ($\text{IC}_{50} = 24.8 \mu\text{M}$).

45

Beispiel 7:

50

Allgemeines Verfahren zur Bestimmung des synergistischen Effektes einer Kombination aus Proteinkinase-C-Inhibitor und einem antineoplastischen Wirkstoff

55

a) Walker Karzinoma-Zellen von Ratten wurden in Suspensionen von DMEM (Dulbeccos Modified Minimal Essential Medium) mit einem 10 %-igen Anteil (v/v) von Pferdeserum und 25 mM MOPS-Puffer (pH 7.35 bei 20 °C) bei einer Temperatur von 36.8 °C gezüchtet. Dosis-Wirkungs-Kurven für einzelne Wirkstoffe oder Wirkstoffkombinationen wurden erhalten durch Zugabe der entsprechenden Wirkstoffe zu einer Suspension von Walker-Zellen (10^5 Zellen/ml). Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen mit Hilfe eines elektronischen Zählers (Coulter-Electronics, Luton, UK) gezählt. Die Vermehrung der Zellen (M) wurde nach folgender Formel berechnet: $M = (T_1 - T_0)/(C_1 - C_0) * 100$, wobei C für die unbehandelten Kontroll-Zellen steht, T die Anzahl der behandelten Zellen bedeutet, und die Indices 0 und 1 für die Zahl der Zellen

zum Zeitpunkt 0 und nach 48 h steht.

Nach der von Chou und Talalay (Eur. J. Biochem. (1981), 115, 207 - 216 und Advances Enzyme Regul. (1984), 22, 27 - 54) beschriebenen Methode wurde der synergistische Effekt der Wirkstoffkombinationen bestimmt. Die zur Berechnung verwendeten Daten beruhen auf mindestens drei verschiedenen Experimenten. Das Berechnungsprogramm wurde bei Elsevier Biosoftware, Cambridge, UK bezogen (Dose effect analysis with microcomputers).

b) $[^3\text{H}]$ -Thymidin Einbau

Der cytostatische bzw. cytotoxische Effekt der Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen auf MethA-Fibrosarkoma-Zellen wurde *in vitro* anhand des verringerten $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbaus untersucht. Die Zellen wurden bis zu einer Endkonzentration von 5×10^4 /ml in Abwesenheit der Wirkstoffe suspendiert in DMEM, 10 % FCS, 50 μM 2-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin. Die Wirkstoffe wurden in einem Volumen von 20 μl zu den Zellen hinzugefügt. Pro Konzentration wurden 6 Kulturen zu 0,2 ml angesetzt und in Mikrotiterplatten bei feuchtem Klima inkubiert. Die Kulturen wurden 3 Std. mit 1 μCi (27 kBq/Zelle) [Methyl- ^3H]-Thymidin (spezifische Aktivität 5 Ci/mmol) gepulst. Die Proben wurden anschließend geerntet und mehrfach gewaschen. Die Filterplatten wurden getrocknet und in Szintillationsgläsern überführt. Der radioaktive Einbau wurde nach Zugabe von Rotisint gemessen.

Beispiel 8:

20

Synergistischer Effekt von Quercetin und cis-Diammino-dichloro-platin (II) (cis-DDP)

Wie in Beispiel 7a beschrieben wurde der Einfluß von cis-DDP, Quercetin und einer Mischung von Quercetin/cis-DDP (molares Verhältnis 100:1) auf Walker-Sarkoma-Zellen von Ratten untersucht. Die Zellen wurden in Gegenwart der jeweiligen Wirkstoffen für eine Dauer von 48 Stunden gezüchtet. Das Ergebnis geht aus Tab. 1 hervor.

Beispiel 9:

30

Synergistische Kombination von Quercetin und Mustargen

Wie in Beispiel 7a angegeben wurde der Einfluß von Quercetin, Mustargen und einer Mischung von Quercetin/Mustargen (molares Verhältnis 800:1) auf Walker-Sarkoma-Zellen von Ratten untersucht. Das Ergebnis geht aus Tab. 1 hervor.

Beispiel 10:

40

Synergistische Kombination von Tamoxifen und cis-DDP

Wie in Beispiel 7a angegeben wurde der Einfluß von Tamoxifen, cis-DDP und einer Mischung aus Tamoxifen:cis-DDP (molares Verhältnis 10:1) auf Walker-Sarkoma-Zellen von Ratten untersucht. Das Ergebnis geht aus Tab. 1 hervor.

Beispiel 11:

50

Synergistische Kombination von Staurosporin und cis-DDP

Wie in Beispiel 7a angegeben wurde der Einfluß von Staurosporin, cis-DDP und einer Mischung aus Staurosporin:cis-DDP (molares Verhältnis 1:100) auf Walker-Sarkoma-Zellen von Ratten untersucht. Das Ergebnis ist in Tab. 1 angegeben.

Beispiel 12:Synergistische Kombination von Ilmofosin und cis-DDP

Wie in Beispiel 7a angegeben wurde der Einfluß von Ilmofosin, cis-DDP und einer Mischung von Ilmofosin/cis-DDP (molares Verhältnis 10:1) auf Walker-Sarkoma-Zellen von Ratten untersucht. Das Ergebnis geht aus Tab. 1 hervor.

Beispiel 13:Synergistische Kombination von ET-18-OCH₃ und cis-DDP

Wie in Beispiel 7a angegeben wurde der Einfluß von ET-18-OCH₃, cis-DDP und einer Mischung von ET-18-OCH₃ (molares Verhältnis 10:1) auf Walker-Sarkoma-Zellen von Ratten untersucht. Ähnlich wie in Beispiel 12 beschrieben ist auch in diesem Falle eine synergistische Wirkung festzustellen (vgl. Tab. 1).

20 Tab. 1

Hemmung der zellulären Replikation und Verstärkung des antiproliferativen Effektes; Zusammenstellung der IC ₅₀ -Werte:					
Bsp.	Proteinkinase C Inhibitor	Hemmung der (1)		IC ₅₀ [μM] (1)	Art der Aktivität (2)
		Proteinkinase C IC ₅₀ [μM]	Zell-Proliferation IC ₅₀ [μM]		
2, 8	Quercetin	25	23	3.8	Synergismus
2, 9	Quercetin	25	23		Synergismus
3, 10	Tamoxifen	11.20	12.44	2.24	Synergismus
4, 11	Staurosporin	0.048	0.04 ⁻	0.004	Synergismus
5, 12	Ilmofosin	0.56	20	2	Synergismus
6, 13	Et-18-OCH ₃	24.8	5.8	1.7	Synergismus
	cis-DDP	> 1000	0.23	-	-

(1) Unter dem IC₅₀-Wert versteht man diejenige Konzentration des Inhibitors, bei der eine 50%-ige Hemmung der Proteinkinase C oder der Zellproliferation erreicht wird.

40 (2) Die Berechnungsgrundlage hinsichtlich des synergistischen Effektes erfolgte nach der Methode von Chou und Talalay (Advances Enzyme Regul. 22, 27 - 54 (1984)).

45 Beispiel 14:

Wie in dem allgemeinen Verfahren in Beispiel 7b) beschrieben wurden die IC₅₀-Werte für eine Kombination von Ilmofosin mit CDDP bzw. Doxorubicin bestimmt. Das Ergebnis geht aus der Tabelle 2 hervor.

Tab. 2

Hemmung der Tumorzellen-Proliferation				
5	Inhibitor PK-C	Antineopl. Wirkstoff	Verhältnis	IC ₅₀ [µg/ml]
	A	B	A:B	
10	Ilmofosin	CDDP	100 : 1	1.09
	Ilmofosin	Doxorubicin	100 : 1	1.11
	Ilmofosin	-	-	1.06

15

Beispiel 15:20 Herstellung von pharmazeutischen Formulierungen

Die als Wirkstoffe ausgewählten Verbindungen A und B können in verschiedenen galenischen Formulierungen verwendet werden. Die nachstehend angegebenen Beispiele betreffen galenische Zubereitungen, die einen mit dem Buchstaben A bezeichneten Wirkstoff als Proteinkinase-C-Inhibitor enthält und einen mit dem Buchstaben B bezeichneten antineoplastischen Wirkstoff.

25

a) Tabletten

30

Mischung I		Mischung II	
Wirkstoff A	50 mg	Wirkstoff B	50 mg
Stärke	180 mg	Siliciumdioxid	100 mg
Magnesiumstearat	20 mg	Laktose	100 mg
		Aerosil	5 mg

35

Mischung I und II werden getrennt voneinander trocken oder feucht granuliert. Anschließend werden sie unter Zusatz von 5 mg Talkum miteinander vermischt und zu Tabletten verpreßt.

45

b) Kapseln

50

Mischung I		Mischung II	
Wirkstoff A	50 mg	Wirkstoff B	200 mg
Lactose	110 mg	Polyvinylpyrrolidon	10 mg
Maisstärke	20 mg	Maisstärke	100 mg
Gelantine	8 mg	Cetina HR	10 mg
Magnesiumstearat	12 mg		

55

Die beiden Mischungen I und II werden getrennt voneinander nach üblichen Verfahren granuliert. In einem geeigneten Mixer werden die beiden Granulate in dem gemischten Mischungsverhältnis miteinander vermischt und das Pulver im Mixer mit Talkum versetzt. Anschließend wird die Mischung maschinell in Hartgelantinekapseln abgefüllt.

c) Injektionslösung i.m. oder i.v.

Eine spritzfertige i.v.-Injektionslösung enthält

5

Wirkstoff A	50 mg
Wirkstoff B	100 mg
Natriumchlorid	20 mg
Natriumacetat	6 mg
dest. Wasser ad	5 ml

10

Eine spritzfertige i.m.-Injektionslösung enthält

15

Wirkstoff A	100 mg
Wirkstoff B	100 mg
Benzylbenzoat	1 g
Injektionsöl	5 ml

20

Ansprüche

25

1. Pharmazeutisches Kombinationspräparat, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Wirkstoffe enthalten sind, wobei der erste Wirkstoff ein Inhibitor der Proteinkinase-C ist, und der andere Wirkstoff antineoplastische Wirkung aufweist, sowie pharmakologisch verträgliche Träger- oder Hilfsstoffe.

30 2. Pharmazeutisches Kombinationspräparat gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff mit antineoplastischer Wirkung ein Lipid, eine Lipid-analoge Verbindung, ein Cytostatikum oder eine Verbindung mit phospholipase-inhibierender Wirkung ist.

35 3. Pharmazeutisches Kombinationspräparat gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff mit antineoplastischer Wirkung ein Cytostatikum ist.

40 4. Pharmazeutisches Kombinationspräparat gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Cytostatica Alkylantien, Metallkomplex-Verbindungen, Antimetabolite, Antibiotika, Hormonantagonisten oder Corticoide sind.

55 5. Pharmazeutisches Kombinationspräparat gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Cytostatica Cyclophosphamid, Chlorambucil, cis-Diammino-dichloro-platin(II), Methotrexat, 5-Fluoruracil, Doxorubicin, Bleomycin oder Tamoxifen sind.

45 6. Pharmazeutisches Kombinationspräparat gemäß einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff, der als Inhibitor der Proteinkinase C fungiert, aus der Gruppe der Lipide, Phospho-, Glyko- oder Neutrallipide oder deren Derivate ausgewählt ist.

7. Pharmazeutisches Kombinationspräparat gemäß einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff, der als Inhibitor der Proteinkinase C fungiert, Quercetin, Tamoxifen, Ilmofosin, ET-18-OCH₃ oder Staurosporin ist.

8. Pharmazeutisches Kombinationspräparat gemäß einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß es Ilmofosin und cis-Diammino-dichloro-platin(II) enthält.

50 9. Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Kombinationspräparaten wie in den Ansprüchen 1 - 8 angegeben, dadurch gekennzeichnet, daß man als Wirkstoffe Verbindungen mit proteinkinase-C-hemmender Wirkung und Verbindungen mit antineoplastischer Wirkung einsetzt.

10. Verwendung von Verbindungen mit Proteinkinase-C inhibierender Wirkung oder von antineoplastischen Wirkstoffen zur Herstellung von pharmazeutischen Kombinationspräparaten wie in den Anprüchen 1 - 8 näher gekennzeichnet.

55 55 Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : ES, GR

1. Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Kombinationspräparaten enthaltend mindestens zwei Wirkstoffe, wobei der erste Wirkstoff ein Inhibitor der Proteinkinase-C ist und der andere Wirkstoff

antineoplastische Wirkung aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß man die Wirkstoffe gegebenenfalls mit pharmazeutisch üblichen Träger- oder Hilfsstoffen in eine geeignete Darreichungsform bringt.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff mit antineoplastischer Wirkung ein Lipid, eine Lipid-analoge Verbindung, ein Cytostatikum oder eine Verbindung mit phospholipase-inhibierender Wirkung ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff mit antineoplastischer Wirkung ein Cytostatikum ist.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die Cytostatica Alkylantien, Metallkomplex-Verbindungen, Antimetabolite, Antibiotika, Hormonantagonisten oder Corticoide sind.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Cytostatica Cyclophosphamid, Chlorambucil, cis-Diammino-dichloro-platin(II), Methotrexat, 5-Fluoruracil, Doxorubicin, Bleomycin oder Tamoxifen sind.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff, der als Inhibitor der Proteinkinase C fungiert, aus der Gruppe der Lipide, Phospho-, Glyko- oder Neutrallipide oder deren Derivate ausgewählt ist.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff, der als Inhibitor der Proteinkinase C fungiert, Quercetin, Tamoxifen, Ilmofosin, ET-18-OCH₃ oder Staurosporin ist.
8. Verfahren gemäß Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß es Ilmofosin und cis-Diammino-dichloro-platin(II) enthält.
9. Verwendung von Verbindungen mit Proteinkinase-C inhibierender Wirkung oder von antineoplastischen Wirkstoffen zur Herstellung von pharmazeutischen Kombinationspräparaten wie in den Ansprüchen 1 - 8 näher gekennzeichnet.

25

30

35

40

45

50

55



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE															
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)												
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 94, 1981, Seite 62, Zusammenfassung Nr. 114601t, Columbus, Ohio, US; M. SLUYSER et al.: "Combined endocrine therapy and chemotherapy of mouse mammary tumors", & EUR. J. CANCER 1981, 17(2), 155-9 * Zusammenfassung * ---	1-7,9, 10	A 61 K 45/06 A 61 K 33/24 // (A 61 K 33/24 A 61 K 31:685)												
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 100, 1984, Seite 33, Zusammenfassung Nr. 132230t, Columbus, Ohio, US; C. BENZ et al.: "tamoxifen and 5-fluorouracil in breast cancer: cytotoxic synergism in vitro", & CANCER RES. 1983, 43(11), 5298-303 * Zusammenfassung *	1-7,9, 10													
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 105, 1986, Seite 25, Zusammenfassung Nr. 202832v, Columbus, Ohio, US; V.V. FOMINA et al.: "New ways to improve the efficacy of tamoxifen in the treatment of mammary cancer", & IZV. AKAD. NAUK KAZ. SSR, SER. BIOL. 1986, (4) 67-70 * Zusammenfassung * ---	1-7,9, 10													
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 98, 1983, Seite 34, Zusammenfassung Nr. 119268g, Columbus, Ohio, US; L.D. MORRIS et al.: "Adjuvant treatment with adramycin, methotrexate and tamoxifen of DMBA induced tumors in the rat", & IRCS MED. SCI.: LIBR. COMPEND. 1982, 10(12), 1045 * Zusammenfassung *	1-7,9, 10													
X	WO-A-8 401 506 (THE UNIVERSITY OF ASTON IN BIRMINGHAM) * Ansprüche 1,5,7 *	1-7,9, 10 -/-													
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p> <table border="1"> <tr> <td>Recherchenort DEN HAAG</td> <td>Abschlußdatum der Recherche 30-11-1989</td> <td>Prüfer PEETERS J.C.</td> </tr> <tr> <td colspan="3">KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelde datum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument </td> </tr> </table>				Recherchenort DEN HAAG	Abschlußdatum der Recherche 30-11-1989	Prüfer PEETERS J.C.	KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelde datum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		
Recherchenort DEN HAAG	Abschlußdatum der Recherche 30-11-1989	Prüfer PEETERS J.C.													
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE															
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur															
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelde datum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument															



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
P, X	<p>DIALOG 07028115, MEDLINE 89330115; J. HOFMANN: "Syneroistic annancement of the antioroliferative activity of cois-diamminedichloroplatinum(II) by the ether lipid analogue BM41440, an inhibitor if protein kinase C", & LIPIDS APRIL 1989, BAND 24, Nr. 4, SEITEN 312-317</p> <p>* Insgesamt</p> <p>---</p>	1-6, 9, 10	
P, X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, Band 109, 1988, Seite 29, Zusammenfassung Nr. 204527f, Columbus, Ohio, US; J. HOFMANN et al.: "Enhancement of the antiproliferative effect of cis-diamminedichloroplatinum(II) and nitrogen mustard by inhibitors of protein kinase C", & INT. J. CANCER 1988, 42(3), 382-8</p> <p>* Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	1-6, 9, 10	
RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl.5)			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche		Prüfer
DEN HAAG	30-11-1989		PEETERS J.C.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelde datum veröffentlicht worden ist		
A : technologischer Hintergrund	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument		
O : nichtschriftliche Offenbarung	L : aus andern Gründen angeführtes Dokument		
P : Zwischenliteratur	& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		